

## **Bioaktive stoffer i torskemuskel** - som kan forebygge diabetes II. Revidert sluttrapport – mai 2009

Asbjørn Gildberg, Britt Nanny Fuglestad og Even Stenberg





Nofima er et næringsrettet forskningskonsern som sammen med akvakultur-, fiskeri- og matnæringen bygger kunnskap og løsninger som gir merverdi. Virksomheten er organisert i fire forretningsområder; Marin, Mat, Ingrediens og Marked, og har om lag 470 ansatte. Konsernet har hovedkontor i Tromsø og virksomhet i Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Averøy.

Hovedkontor Tromsø  
Muninbakken 9–13  
Postboks 6122  
NO-9291 Tromsø  
Tlf.: 77 62 90 00  
Faks: 77 62 91 00  
E-post: [nofima@nofima.no](mailto:nofima@nofima.no)

Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)



Vi driver forskning, utvikling, nyskaping og kunnskapsoverføring for den nasjonale og internasjonale fiskeri- og havbruksnæringa. Kjerneområdene er avl og genetikk, fôr og ernæring, fiskehelse, bærekraftig og effektiv produksjon samt fangst, slakting og primærprosessering.

Nofima Marin AS  
Nofima Marin  
Muninbakken 9–13  
Postboks 6122  
NO-9291 Tromsø  
Tlf.: 77 62 90 00  
Faks: 77 62 91 00  
E-post: [marin@nofima.no](mailto:marin@nofima.no)

Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

# Rapport

<i>ISBN:</i> 978-82-7251-661-0	<i>Rapportnr.:</i> 30/2008	<i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
-----------------------------------	-------------------------------	--

<i>Tittel:</i> <b>Bioaktive stoffer i torskemuskel -som kan forebygge diabetes II Revidert sluttrapport – mai 2009</b>		<i>Dato:</i> Desember 2008
		<i>Antall sider og bilag:</i> 14
<i>Forfatter(e):</i> Asbjørn Gilberg, Britt Nanny Fuglestad og Even Stenberg		<i>Prosjektnr.:</i> 20556
<i>Oppdragsgiver:</i> MABIT		<i>Oppdragsgivers ref.:</i> Unn Sørum
<i>Tre stikkord:</i> Torskemuskel, proteinfraksjonering, fett ekstraksjon		
<i>Sammendrag: (maks 200 ord)</i> <p>Det er fremstilt tørt fiskemuskelprotein i pilotskala. Mesteparten av fettene ble fjernet fra proteinet ved etanolekstraksjon. Ved Institutt for Medisinsk Biologi, UiT, er proteinpulveret brukt i føringforsøk med rotter for å studere utvikling av hjerte/kar-sykdommer og diabetes II.</p> <p>Det er utført laboratorieforsøk for å utvikle metoder til utvinning og fettekstraksjon av rensede fraksjoner av torskemuskelprotein i pilotskala. De oppnådde resultater viser at både sarcoplasma- og myofibrillfraksjon kan fremstilles ved ekstraksjon av torskemuskel ved hjelp av metoder som lett kan oppskaleres til pilotskala med utstyr som allerede er tilgjengelig i prosesshall ved Nofima Marin i Tromsø.</p> <p>Resultater fra det første føringforsøk med rotter ved IMB viste ikke at torskemuskelprotein i føret bidro til å hindre en diabetes fenotyp mhp hjertets metabolisme. Forsøkene blir imidlertid gjentatt da mye tyder på at fastetiden før føringforsøket hadde vært for lang.</p> <p>Føringforsøk med rotter er utført ved Laval University, Quebec, men detaljerte resultater er foreløpig ikke mottatt. Det ble ikke oppnådd stor vektøkning hos rottene, slik som forventet, og de fysiologiske testene (bla test for insulinfølsomhet) var vanskelige å tolke. Så snart detaljerte resultater foreligger, vil disse bli ettersendt.</p> <p>Ved en videreføring av prosjektet, der målsetningen er å klarlegge muskelkomponentenes biologiske virkemåte, vil det være naturlig å gjøre dyreforsøk eller humane studier der forskjellige muskelproteinfraksjoner framstilles i pilotskala og inngår i parallelle forsøksserier.</p>		

# Innhold

<b>1</b>	<b>Innledning .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Materialer og metoder .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Resultater og diskusjon.....</b>	<b>5</b>
3.1	Muskelfett og fettekstraksjon.....	5
3.2	Framstilling av torskemuskelprotein i pilotskala .....	6
3.3	Rensing av myofibrillfraksjonen. ....	7
3.4	Bioaktive stoffer i torskemuskel.....	10
3.5	Resultater fra rotteforsøk utført ved IMB .....	11
3.6	Kjemisk sammensetning av torskemuskelprotein framstilt i pilotskala til nytt fóringsforsøk i 2009.....	12
<b>4</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>Litteraturliste .....</b>	<b>14</b>

# 1 Innledning

Nofima har etablert et program for videreutvikling av kompetanse innenfor temaområdet "Sjømat og helse". Programmet har som målsetting å styrke kompetansen gjennom et samarbeid mellom instituttet og flere miljø ved Universitetet i Tromsø, samt sørge for tilgang på internasjonal spisskompetanse på området.

Livsstilsykdommer er et økende problem. Dette skyldes ofte feil kosthold, og overflod av mat kombinert med lite mosjon. Hjerte/kar sykdommer har lenge vært den viktigste av livsstilsykdommene. Kampanjer mot røyking og økt bevissthet rundt bruk av umettet marint fett, har her bidratt til en positiv utvikling. Vitenskapelige undersøkelser har bekreftet at økt inntak av sjømat er det beste forebyggende middel mot hjerte/kar sykdommer.

Det er nå en eksplosiv vekst i forekomsten av diabetes II, som regnes som en av de største helsemessige utfordringer i kommende år. Det registreres samtidig en økende frekvens av overvekt også blant de yngre. Hver åttende innbygger i New York har i dag diagnosen diabetes II, og uten tiltak er det sannsynlig at utviklingen i Norge går i samme retning. Det er vist at ingredienser i sjømat innvirker på utviklingen av diabetes II, men virkemekanismene er ikke kjente. Det er likevel bred enighet om at det å øke inntaket av sjømat, trolig er et godt tiltak for å bedre den allmenne helsetilstand i befolkningen.

Nofima Marin har i de siste to år drevet aktivt nettverksarbeid for å kunne tilføre mest mulig kompetanse på området "Sjømat og helse". Det har vært særdeles viktig å knytte medisinske forskningsmiljø til de tekniske forskningsmiljøer på en slik måte at helsemessig dokumentasjon kan formidles og komme til anvendelse. Som et ledd i gjennomføringen av programmet "Sjømat og helse" er det knyttet kontakter til flere miljø ved Universitetet i Tromsø. Det er etablert et samarbeid med professor Edel Elvevoll ved Norge Fiskerihøgskole (UiT) og professor Bjarne Østerud ved Institutt for medisinsk biologi (UiT) vedrørende problemstillinger rundt prosessering av sjømat og tap av komponenter i sjømat med positiv helsemessig virkning. Det er videre innledet et samarbeid med professor Terje Larsen ved Institutt for medisinsk biologi (UiT) om betydningen av sjømat for å forebygge utvikling av diabetes II. Terje Larsen er gjennom Fiskeriforsknings internasjonale kontakter knyttet opp til professor André Marette ved Laval University, Quebec, Kanada, som allerede har gjort banebrytende arbeid relatert til torskprotein og utviklingen av diabetes.

Fiskeriforskning har i over 20 år samarbeidet med Universitetet i Tromsø (prof. Bjarne Østerud, IMB) når det gjelder betydningen av fiskeolje i bekjempelse av hjerte/kar-sykdommer, et arbeid vi mener har vært svært vellykket. Dette prosjektet innleder et tilsvarende samarbeid mellom Nofima Marin og Universitetet i Tromsø når det gjelder å undersøke effekten av fiskeproteiner mot utvikling av diabetes. Prof. Terje Larsen ved IMB, har høy kompetanse på diabetesstudier på mus (Bratkovsky, *et al.*, 2006; Hafstad *et al.*, 2007; Aasum *et al.*, 2005). Han benytter to musetyper; en såkalt db/db mutant som har en aggressiv diabetestype som ligner på diabetes II hos mennesker, og en mer vanlig musetype som har utviklet diabetes på grunn av lang tids føring på fettrik diett. Det er tidligere utført ett forsøk med bruk av fiskeprotein (framstilt av Fiskeriforskning) i dietten til disse musetyperne, men forsøkene var mislykket fordi det oppsto nyresvikt hos musene.

Nofima Marin bidrar i dette prosjektet først og fremst med sin kompetanse på fiskeråstoff og fiskeproteiner, men instituttet har også tilegnet seg basiskompetanse gjennom forskning på bioaktive proteiner og peptider fra marine råstoffer. Eksempler på dette er påvisning og karakterisering av peptider som hindrer utvikling av aids-virus, peptider som ved kontrollert inntak kan redusere høyt blodtrykk (ACE-hemmere) (Bordenave *et al.*, 2002) og immunstimulerende og antibakterielle histonproteiner fra torsk (Pedersen *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2004). Instituttet har også forskningskompetanse med nær tilknytning til Terje Larsen's gruppe på IMB (Aasum *et al.*, 2005).

Fiskeriforskning har allerede framstilt et prøveparti på ca 10 kg torskemuskelprotein som er sendt til Laval University i Kanada. Dette benyttes nå til forskjellige in vivo forsøk som har til hensikt å kartlegge positive effekter av fiskemuskelprotein mot utvikling av diabetes II. Det blir her lagt vekt på å måle effekter av proteindelen. Best mulig fjerning av fettstoffer, og karakterisering av restfettstoffer er viktig for å kunne skille mellom effekter av fett og protein. Et viktig element i dette prosjektet er derfor å undersøke hvordan fett kan fjernes mest mulig effektivt i pilotskala med kommersielt tilgjengelig utstyr.

## 2 Materialer og metoder

Filét av torsk (*Gadus morhua*) har vært råstoff i forsøkene som er utført. Det er benyttet både villfanget torsk og oppdrettstorsk, og størrelsen har vært 2-5 kg rundfiskvekt. Fisken er brakt til kjølerom på is, hvor den er håndfiléert og avskinnert.

### Homogenisering

Ved forsøk i laboratorieskala er torskefilét homogenisert med "Waring blender" eller malt på kjøttkvern, mens det ved pilotskalaforsøk er benyttet hurtighakke (Krämer - Grebe).

### Protein

Protein ble målt med Kjeldahl-metoden etter oppløsning av prøvene i svovelsyre.

### Tørrestoff og aske (mineralsalter)

Tørrestoff ble bestemt gravimetrisk etter tørking ved 105°C og aske etter ca 20 timer ved 550°C.

### Totalt fettinnhold

Totalt fett ble bestemt ved Soxhlet-ekstraksjon med petroleum benzene og ved Bligh & Dyer's metode.

### Aminosyreanalyse

Aminosyresammensetning ble bestemt etter hydrolyse med 6 N HCl i 24 timer, derivatisering med phenylisothiocyanat og separasjon på HPLC.

### Etanolekstraksjon av lufttørket (40°C) og frysetørket torskemuskel

Hvit muskel fra oppdrettstorsk ble malt på kjøttkvern. Tørrestoff, aske og fett (Bligh & Dyer) ble bestemt. To porsjoner muskelmasse (300 g) ble frysetørket eller lufttørket (40°C). Tørket muskel (15 g) ble tilsatt etanol (60 ml) og ekstrahert ved sakte omrøring 30 min ved 25°C. Prøvene ble så sentrifugert ved 2000 x g, og supernatantvolum ble bestemt. Dette forsøket ble utført først og fremst for å sammenligne hvor mye etanol som ble absorbert i henholdsvis frysetørket og lufttørket (40°C) torskemuskel, fordi dette har avgjørende betydning for hvor effektivt fett kan ekstraheres fra muskelmassen.

### Pilotskalaforsøk med framstilling av avfettet torskemuskelpulver

Nitti kg sløyd og hodekappa fersk torsk (å 2-3 kg) ble transportert på is fra Båtsfjord. Fisken ble filéert ca to dager etter fangst, skinnert og homogenisert på hurtighakke (Krämer – Grebe). Fiskemassen ble koagulert ved tilførsel av steam til temperatur ca 60°C. Massen ble så tørket på Hozokawa vakuomtørke. Etter 5-6 timers tørking ble tørka tømt, rensket og fylt på nytt før tre timers sluttørking ble utført. Tørt pulver (5.9 kg) ble så ekstrahert med etanol for å fjerne mest mulig fett. Ekstraksjonen ble utført i en lukket, roterende, skråstilt tønnekonteiner (Scaniro) (Φ: ca 60 cm; h: ca 90 cm). Konteineren hadde fire avrundete, langsgående, innvendige skovler og et indre volum på ca 250 l. Rotasjonshastigheten var 8 rpm og ekstraksjonstemperatur var 27°C. Det ble utført ekstraksjon i to trinn. Først ca 90 min med 17 l etanol hvorefter 10 l etanolekstrakt ble dekantert av og 13 l ren etanol ble tilført. I andre trinn ble ekstrahert i ca 30 min hvorefter 15 l etanolekstrakt ble dekantert av. Samlet ekstraktvolum ble dermed 25 l. Ekstrahert, etanolfuktig pulver ble lufttørket tre dager i avtrekk ved 20°C i en gjennomstrømningstørke med filterbunn.

### **Framstilling av myofibrillprotein (metodeutvikling)**

Torskemuskel inneholder 75-80 % myofibrillprotein, nesten 20 % sarcoplasmprotein og 2-3 % bindevevsprotein (Haard, 1995).

En standardmetode for ekstraksjon av torskemyofibrillprotein er å homogenisere torskemuskel i 4 deler fosfatbuffer (pH 7.5) tilsatt 0.45 M KCl. Etter en time på kjølerom tilsettes på nytt 4 deler buffer, blandingen homogeniseres og sentrifugeres for å fjerne bindevevsproteiner. Supernatanten inneholder nå både sarcoplasma- og myofibrillprotein. Ved laboratorieforsøk utfeltes så myofibrillprotein ved dialyse for å skille det fra sarcoplasmafraksjonen som sediment etter sentrifugering (Hjelmeland og Raa, 1979). Ved framstilling av prøvemateriale i pilotskala er det komplisert å benytte dialyse som et fraksjoneringsstrinn. I dette prosjektet ble det derfor utviklet en metode der fortykning med vann ble benyttet i stedet for dialyse.

En oppløsning av torskemyofibrill, framstilt ved standardprosedyre, ble tilsatt forskjellige volumer (fra 0.5 del til 5 deler) kaldt vann og satt til henstand over natt ved ca 5°C. Klar vannfase ble dekantert før protein/vannfase ble sentrifugert (40 min, 7000 x g) og proteinsedimentet veid. Disse målingene viste hvor stor fortykning som var nødvendig for å oppnå effektiv utfelling av myofibrillprotein.

I løpet av prosjektperioden ble det ikke behov for å framstille myofibrillprotein i pilotskala. Da dette trolig vil bli aktuelt ved en videreføring av arbeidet, ble det satt opp et laboratorieforsøk der det ble benyttet tekniske løsninger som lett kan oppskaleres til pilotskala med eksisterende utstyr i prosesshall hos Nofima Marin.

Fersk torskemuskel, 100 g, ble skåret i småbiter og tilsatt 200 ml 0.45 M KCl-løsning. Etter homogenisering (1 min, Waring blender) (dette trinnet kan oppskaleres til 5 -10 kg torskemuskel i "Robot coupe"- hurtighakker), ble pH justert til 7.5, og blandingen satt til henstand på kjølerom (10° C) en time før nye 200 ml KCl-løsning ble tilsatt. Etter ny homogenisering og henstand ca 40 min på kjølerom, ble blandingen sentrifugert (40 min, 7000 x g) for å fjerne uoppløst bindevevsprotein (Dette trinnet utføres oppskalert med dekanter-sentrifuge.). Supernatant (438 g) ble tilsatt 5 deler vann (2.19 l) og blandingen fikk stå over natt ved 4°C (I pilotskala kan 1000 l plastkonteiner brukes) før utfelt myofibrillprotein ble sentrifugert fra. Dette trinnet vil trolig være lettest å oppskalere ved bruk av konvensjonelt separatorutstyr som er tilgjengelig i forsøkshall. Slam/sedimentfasen, som inneholder myofibrillprotein, ble frysetørket (pilotskala frysetørking kan leies hos tromsøbedrift).

### **Etanolekstraksjon av frysetørket myofibrillprotein**

Analyser viste at myofibrillproteinfraksjonen også inneholder ca 0.5 % fett (Soxhlet). Det ble gjort forsøk med etanolekstraksjon i to trinn for å bestemme praktisk og teoretisk ekstraksjonseffektivitet.

### **Rotteforsøk ved IMB UiT**

Det ble gjennomført fôringsforsøk med rotter, inndelt i følgende grupper (n=10 per gruppe):

Kontroll: Rotter føret med standard rottefôr. Casein: Rotter føret med diett tilsatt casein i tillegg til høyt fett- og sukkerinnhold. Casein + omega-3: Rotter føret med diett tilsatt casein og 1% omega-3 i tillegg til høyt fett- og sukkerinnhold

Torsk: Rotter føret med diett tilsatt torskeprotein i tillegg til høyt fett- og sukkerinnhold

Rottene ble føret i 2 måneder, deretter avlivet. Det ble tatt vevsprøver, og hjertene ble brukt i metabolismemålinger.



### 3 Resultater og diskusjon

Det er kjent at marint fett har egenskaper som kan redusere risiko for å få en rekke forskjellige sykdommer. Ettersom vi her er ute etter å undersøke om fiskeproteiner kan ha lignende egenskaper, er det viktig å fjerne mest mulig av fett fra muskelmassen før forsøksserier settes opp. Når vi bruker torskemuskel som råstoff, er det særlig fordi den i utgangspunktet har et svært lavt fettinnhold (bare 0.6-0.7 %).

Torskemuskel inneholder hovedsakelig polare lipider, og phosphatidylcholin er dominerende lipidklasse (Ackman, 1995). Ved ekstraksjon av slike lipider er det derfor naturlig å velge et polart fettløsningsmiddel som etanol. Andre fordeler med etanol er liten toksisitet overfor dyr og mennesker, men sterkt hemmende virkning på bakterievekst.

#### 3.1 Muskelfett og fett ekstraksjon

I et innledende pilotforsøk ble tørket torskemuskelpulver (12 kg) ekstrahert med etanol (50 l). Ved denne ekstraksjonen, som var en ettrinns ekstraksjon, ble ca halvparten av fett fjernet. Lipidsammensetning i restfettet ble analysert og er vist i Tabell 1.

Tabell 1 *Kvantitativ sammensetning av restfett i torskemuskelpulver etter etanol-ekstraksjon (ett trinn), angitt i g/ 100 g lipid.*

Triacylglycerol	2.0
Diacylglycerol	< 0.5
Monoacylglycerol	< 1
Frie fettsyrer	54
Kolesterol	7.8
Kolesterol estere	< 0.5
Phosphatidyletanolamin	7.3
Phosphatidylinositol	0.7
Phosphatidylserin	1
Phosphatidylcholin	26
Lyso-Phosphatidylcholin	1.5
Totale polare lipider	36,5
Totale nøytrale lipider	64.0

Tabellen viser at muskelpulverets restfett inneholder mer av nøytrale- enn av polare lipider. Dette bekrefter at det polare løsningsmiddelet etanol gir mer effektiv ekstraksjon av den polare fettfraksjonen som i utgangspunktet er dominerende i torskemuskel (Ackman, 1995).

Det er gjort forsøk som tyder på at proteinfasen fra torskemuskel kan ha positiv helseeffekt både når det gjelder utvikling av diabetes II og hjerte/karsykdommer, men virkemekanismene er ukjent. Dermed er det også usikkert om proteinets tilstand, om det er nativt eller denaturert, er avgjørende for virkningen. Det var derfor relevant å sammenligne effektiviteten av fett fjerning fra frysetørket (nativt protein) og lufttørket (denaturert protein).

Til slike forsøk ble benyttet fersk muskel fra oppdrettstorsk med følgende kjemiske sammensetning:

Totalt tørrstoff:	19,0%
Vann:	81,0%
Protein:	17,5 %
Aske:	1,1 %
Fett (Bligh & Dyer)	0,43 %
Fett (Soxhlet)	0,3 %

Soxhlet-ekstraksjon med petroleum benzene gir ikke fullstendig ekstraksjon av de mest upolare fettstoffene, så Bligh & Dyer's metode regnes for å gi et mer riktig svar når det gjelder råstoffer med mye phospholipider, slik som fiskemuskel. På tørrstoffbasis utgjør fett 2.3 % (Bligh & Dyer).

Det viste seg at finfordelt "pulver" av frysetørket muskelmasse absorberte mye mer etanol ved ekstraksjon enn muskelmasse lufttørket ved 40°C. Etter sentrifugering (2000 x g, 15 min), ble det bestemt følgende etanolmengder i muskelmassesediment:

Frysetørket pulver:	3.21 l etanol/kg pulver
Lufttørket pulver:	0.83 " / "

Dette viser at mye mindre etanol trengs for å ekstrahere fett fra lufttørket (denatureert) muskelmasse enn fra frysetørket (nativ) muskelmasse.

Et ekstraksjonsforsøk med lufttørket muskelmasse ga følgende resultat:

Ettrinns-ekstraksjon (15 g + 60 ml):

Total ekstrahert mengde: 2.4 % av tørrstoff

Tottrinns-ekstraksjon (15 g + (35 + 25) ml):

Total ekstrahert mengde: 3.2 % av tørrstoff

Total ekstrahert mengde er litt høyere enn totalmengde fett målt med Bligh & Dyer's metode. Dette skyldes at etanolen i tillegg til fettstoffer også ekstraherer en del andre relativt upolare komponenter som finnes i muskelens sarcoplasmafraksjon.

### 3.2 Framstilling av torskemuskelprotein i pilotskala

Fra 90 kg sløyd og hodekappa torsk ble det framstilt 37.75 kg fiskemuskelmasse. Etter koagulering ved 60°C veide massen 40.5 kg. Totalt pulverutbytte etter tørking var 5.9 kg. Dette tilsvarer bare 15.6 % av fiskemassen, men noe pulver gikk tapt fordi det klebet seg til tørkeveggen. Etter ekstraksjon i to trinn med 17 + 13 l etanol og lufttørking ble det oppnådd et utbytte på 5.76 kg. Tabell 2 viser kjemisk sammensetning av oppmalt muskelmasse og tørt pulver før og etter etanolekstraksjon.

Tabell 2 Kjemisk sammensetning av muskelmasse og tørt muskelpulver før og etter etanolekstraksjon (% w/w).

	Muskelmasse	Muskelpulver	
		Før ekstraksjon	Etter ekstraksjon
Tørrstoff:	18,6	96,5	92,7
Protein:	17,6	90,2	89,0
Fett (Soxhlet):	-	0,8	0,2
Fett (Bligh & Dyer):	0,44	-	-
Aske:	1,1	5,98	5,35

Tabellen viser at ca ¾-deler av fettene blir fjernet når 6 kg muskelpulver ekstraheres med 17 + 13 liter etanol ved 27°C.

Ved dekantering av etanol etter ekstraksjonstrinnene ble det oppnådd henholdsvis 10.0 og 15.22 liter. Ut fra dette kan vi beregne ekstraksjonsutbytte ved ideell ekstraksjon): teoretisk ekstraktutbytte:

$$\begin{aligned} \text{Første trinn: } & \frac{100 \% \times 10.0 \text{ l}}{17 \text{ l}} & = 58.82 \% \\ \text{Andre trinn: } & \frac{41.18 \% \times 15.22 \text{ l}}{(7 + 13) \text{ l}} & = 31.34 \% \\ \text{Til sammen: } & & \underline{90.16 \%} \end{aligned}$$

Beregningen viser bedre resultat enn praktisk resultat, men måleresultat er beregnet ut fra måleverdier med bare ett tallsiffer og nøyaktigheten er begrenset av dette.

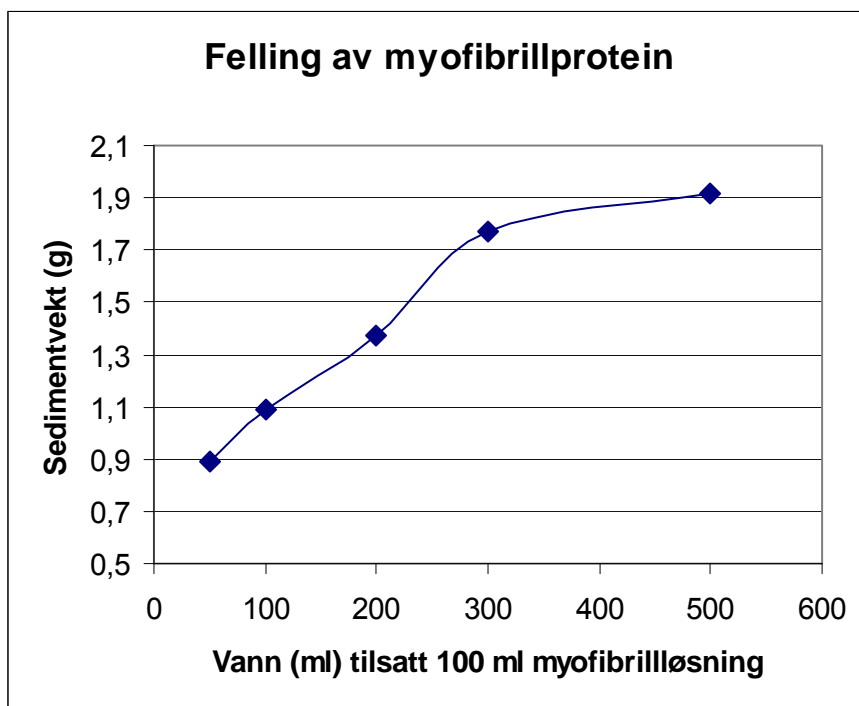
Ut fra tabellen kan beregnes at mengde aske av tørrstoff reduseres fra 6.2 til 5.8 % under etanolekstraksjonen. Dette viser at også små mengder mineraler blir oppløst i etanolen.

Størstedelen av prøvematerialet fra pilotforsøket er benyttet til *in vivo*- forsøk med rotter ved IMB under ledelse av professor Terje Larsen.

### 3.3 Rensing av myofibrillfraksjonen.

Dersom virkemekanismer av torskproteiner *in vivo* skal klarlegges, er det viktig å se nærmere på virkninger av definerte proteinfraksjoner. Det arbeid som her beskrives er metodeutvikling for framstilling av myofibrillprotein fra torskemuskel i pilotskala.

Ekstraksjon av myofibrill og fjerning av bindevevsprotein ble utført etter standardprosedyrer som lett lar seg oppskalere. Selektiv utfelling av myofibrillprotein ble imidlertid utført ved hjelp av fortyning av ekstraktet med vann i stedet for ved dialyse, som er standardprosedyre. Figur 1 viser hvor effektiv myofibrillutfellingen er som funksjon av forskjellig fortyningsgrad av en myofibrilløsning i 0.45 M KCl.



Figur 1 Mengde myofibrillsediment som funksjon av mengde vann (ml) tilsatt 100 ml av myofibrilløsning (0.45 M KCl).

Figuren viser at myofibrillutfellingen nærmer seg optimum når fortynningsgraden er 5 : 1, og denne fortynningsgraden ble derfor benyttet i et påfølgende eksperiment som hadde til hensikt å få et mest mulig realistisk utbyttmål ved et forsøksopplegg som lett kan oppskaleres i forsøkshall med eksisterende utstyr.

Omkring 75-80 % av proteinet i torskemuskel er myofibrillprotein. Dett betyr at 100 g torskemuskel inneholder 12-13 g myofibrillprotein. I vårt forsøk, der fortynning 1 : 5 ble benyttet i stedet for dialyse, ble det totalt oppnådd 12.45 g produkt etter frysetørking. Analyser viste at produktet inneholdt 13.13 % mineraler og 0.5 % fett (upolar fettfraksjon; Soxhlet-ekstrakt). Dette betyr at mengde myofibrillprotein oppnådd var ca 10.75 g (vil inneholde litt fosfolipider). Dette betyr at myofibrillutbyttet var ca 80-85 %. Dette må sies å være svært godt og viser at metoden er velegnet til framstilling av myofibrillprotein i pilotskala. Eksempelvis skal det være mulig å framstille ca 1 kg myofibrillprotein fra 10 kg torskemuskel.

Forsøk utført med frysetørket eller fryselauret torskemuskel ga dårligere utbytte. Dette viser at ferskt råstoff bør benyttes ved ekstraksjon av myofibrillprotein.

Det er uvisst om medisinske effekter av fiskemuskelproteiner er avhengige av native (ikke denaturerte) molekyler, og tidligere forsøk med tørket muskelpulver indikerer at det trengs mindre ekstraksjonsvolumer for å fjerne fett fra denaturert enn fra nativt materiale. Dette skyldes i første rekke at nativt protein absorberer større mengder løsningsmiddel enn denaturert protein.

Ved ekstraksjon av nativt myofibrillprotein fra torsk med etanol, viste det seg at 1 g protein etter ekstraksjon (60 min, 20°C) og sentrifugering (20 min, 2000 x g) absorberte 12.5 ml etanol. Når sedimentet ble resuspendert og ekstrahert en gang til i et nytt volum etanol (> 12.5 ml) var absorbert etanolvolum i sediment det samme som etter første ekstraksjon): i dette tilfelle 12.5 ml.

Ved ekstraksjon av 1.00 g myofibrill (96.5 % tørrstoff) med 20 ml etanol ble 1.25 % tørrstoff ekstrahert ut. Ved ekstraksjon med 2 x 20 ml ble til sammen 2.66 % av tørrstoffet ekstrahert. Dersom vi går ut fra 1.25 % ekstrahert tørrstoff ved første ekstraksjon og beregner teoretisk utbytte ved andre ekstraksjon, blir resultatet slik:

$$(1.25 \% \times 12.5 \text{ ml} \times 20 \text{ ml}) / (7.5 \text{ ml} \times 27.5 \text{ ml}) = 1.52 \%$$

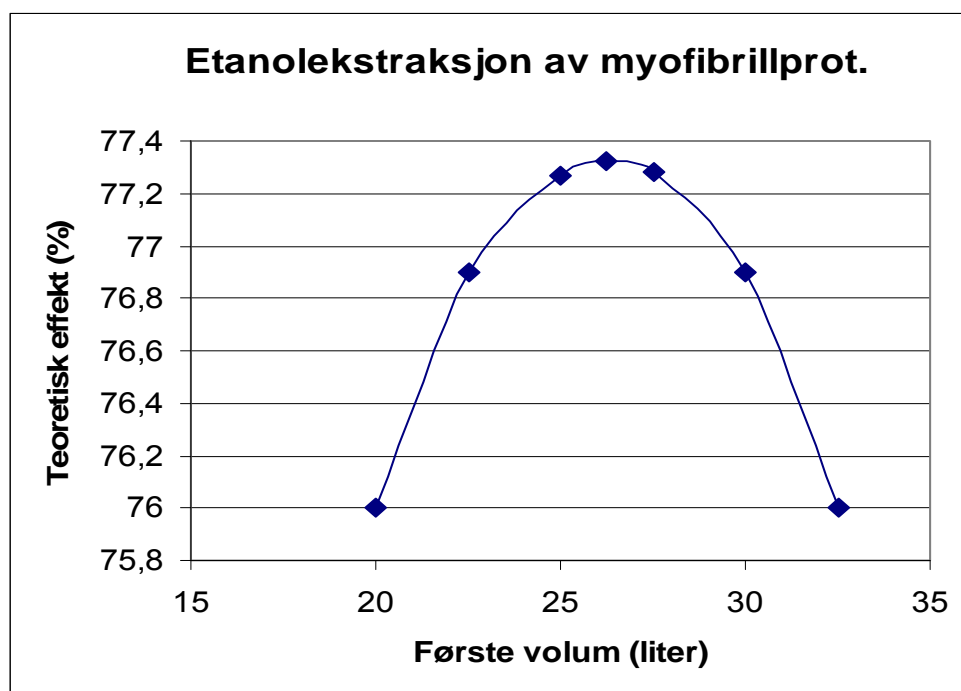
$$\text{Totalt teoretisk utbytte blir da: } 1.25 \% + 1.52 \% = 2.77 \%$$

Ettersom målt utbytte (2.66 %) er ganske likt teoretisk utbytte (2.77 %), er det relevant å beregne teoretisk utbytte ved forskjellige ekstraksjonsvolumer. Dersom vi velger to-trinns ekstraksjon av torskemyofibrill med etanol, kan vi sette opp følgende uttrykk for ekstraksjonseffektivitet :

$V_{\text{tot}}$  = Totalt ekstraktantvolum;  $X$  = Første ekstraktantvolum;  $S$  = ekstraktantvolum i sediment;  $Y$  = ekstraksjonseffektivitet i %.

$$Y = 100 \% ((X - S) / X) + 100 \% (1 - (X - S) / X) (V_{\text{tot}} - X) / (V_{\text{tot}} - X + S)$$

Dersom vi tar utgangspunkt i forsøket med to-trinns ekstraksjon av 1.00 g myofibrill med totalt 40 ml etanol, kan vi illustrere ekstraksjonseffektiviteten med Figur 2:



Figur 2 Teoretisk ekstraksjonsutbytte (i % av ekstraherbart materiale) som funksjon av første ekstraktantvolum dersom én vektandel torskemyofibrill ekstraheres med totalt 40 volumdeler etanol.

Figuren viser at best ekstraksjon blir oppnådd dersom 26.25 ml etanol brukes i første ekstraksjonsvolum. Dette viser seg å være det volum som gir samme supernatantvolum etter sentrifugering (her 13.75 ml) i begge ekstraksjonstrinn. Det er grunn til å tro at dette også vil være tilfelle ved andre ekstraksjonsvolumer, selv om matematisk bevis for dette her ikke er utledet.

Muskelprotein kan deles i tre hovedgrupper; myofibrillproteiner som utgjør det kontraktile apparatet (hos torsk: 75-80 %), sarkoplasmaproteinene som er globulære vannløselige proteiner med utallige biokjemiske funksjoner (enzymmer etc) (15-20 %) og bindevevsproteiner (særlig kollagen) som opprettholder fysisk struktur (2-3 %). Tabell 3 viser aminosyresammensetningen for disse tre fraksjonene fra torskemuskel.

*Tabell 3 Aminosyresammensetning (g/100 g aminosyrer) i hydrolysater av torskemuskel og av de tre hovedfraksjonene av proteiner fra torskemuskel.*

Aminosyre	Torskemuskel	Myofibrillfraksjon	Sarcoplasmafraksjon	Kollagen*
Asparaginsyre	9,8	11,5	11,5	6,4
Glutaminsyre	15,2	16,7	11,9	9,7
Hydroksyprolin	-	-	-	6,8
Serin	4,8	4,6	4,5	6,1
Glycin	5,3	4,0	5,9	24,9
Histidin	2,3	2,2	2,8	1,7
Arginin	7,1	6,9	7,0	8,6
Treonin	4,9	4,5	4,3	2,5
Alanin	6,3	5,7	6,9	8,5
Prolin	3,7	2,9	3,1	10,4
Tyrosin	3,5	4,0	3,3	0,8
Valin	5,4	5,5	6,4	1,8
Metionin	3,6	3,7	3,2	2,3
Isoleucin	5,0	5,2	5,5	1,3
Leucin	8,7	8,9	8,3	2,4
Fenylalanin	4,5	4,2	5,7	1,8
Lysin	9,7	9,7	9,6	3,7

\*Arnesen & Gildberg (2007)

Tabellen viser, som forventet, at det er liten forskjell i aminosyresammensetning mellom torskemuskel og myofibrillfraksjonen, som er muskelens hovedproteinfraksjon. Myofibrillfraksjonen inneholder noe mer av den typiske "kjøtt-aminosyren"; glutaminsyre og asparaginsyre og noe mindre av de typiske "kollagen-aminosyrene"; glycin og prolin. Sarcoplasmafraksjonen har en aminosyre-sammensetning som ligner den til myofibrillprotein, men inneholder mye mindre glutaminsyre og noe mer glycin, alanin og fenylalanin. Strukturproteinene kollagen avviker sterkt fra de tre andre, først og fremst på grunn av sitt høye glycininnholdet.

### 3.4 Bioaktive stoffer i torskemuskel

I utgangspunktet er torskemuskel, eller fiskemuskel generelt, ganske lik muskel fra andre høyere dyr. Spesielt gjelder dette det kontraktile muskelapparat som består av myofibrillproteiner. Den kjemiske sammensetning av bindevevsfraksjonen er også svært lik tilsvarende vevsfraksjoner hos pattedyr. Sarcoplasmafraksjonen, som både inneholder svært mange forskjellige globulære proteiner og dessuten en lang rekke forskjellige ekstraktivstoffer, er trolig den hovedfraksjon som avviker mest både mellom forskjellige fiskeslag og mellom fisk generelt og og varmblodige dyr. En kvalifisert gjetning ville derfor tilsi at; dersom det påvises spesielle biologisk effekter ved inntak av fiskemuskelprotein, vil det være mest naturlig å lete etter spesielle virkestoffer i sarcoplasmafraksjonen. Det er godt kjent at muskel fra marin fisk er rik på ekstraktivstoffer som taurin, trimetylaminoksid og en rekke forskjellige aminer. Dessuten har fiskemuskel generelt et høyere innhold av frie aminosyrer og små peptider enn det en vanligvis finner hos varmblodige dyr (Haard, 1995).

Renfremstilling av myofibrillproteiner er allerede beskrevet, og renfremstilling av sarcoplasmafraksjonen vil delvis være samme prosedyre. Muskelen inneholder mindre sarcoplasmaprotein enn myofibrillprotein, men det vil være enkelt å renframstille sarcoplasmaproteiner ved homogenisering, vannekstraksjon og inndamping av vannløselig fraksjon etter fraseparasjon av sediment ved sentrifugering. Sedimentet vil inneholde både myofibrillproteiner og bindevev, og dersom det benyttes mager fiskemuskel, vil trolig mesteparten av fettene også være bundet til sedimentfraksjonen.

Dette viser at det vil være relativt enkelt å framstille både sarcoplasma- og myofibrillfraksjon i pilotskala. Det vil imidlertid kreves nokså store råstoffmengder dersom sarcoplasmafraksjonen skal benyttes som proteinkilde i større fôringsforsøk.

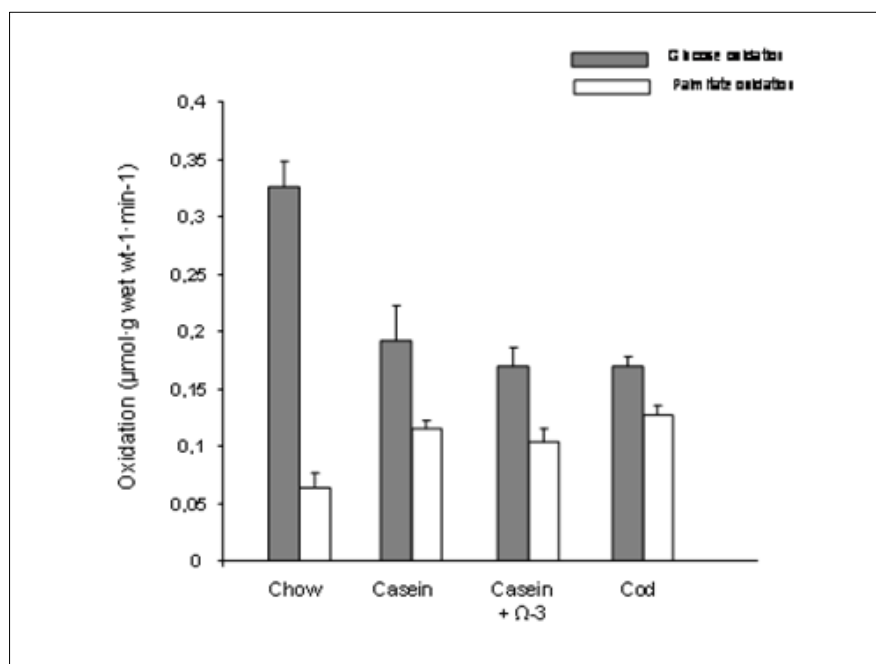
### 3.5 Resultater fra rotteforsøk utført ved IMB

Kontrollgruppen (tilført casein-fôr) hadde en 50% økning i kroppsvekt fra foringsstart til avlivning. De tre "behandlede" gruppene hadde en økning på ca. 80% i kroppsvekt. Gruppen foret med torskprotein hadde den høyeste vektøkningen, men det var ikke signifikant forskjell i forhold til de andre behandlede gruppene.

Mengde abdominalt fett økte signifikant i de behandlede gruppene i forhold til kontroller, men det var ingen forskjell mellom de behandlede gruppene.

Det ble registrert et skifte i stoffomsetningen fra glukose- til fettforbrenning i de behandlede gruppene (se figur 3), noe som tyder på en diabetisk fenotype.

Funksjonsmålinger i hjertet (aortaflow, koronarflow og trykk i venstre ventrikel) avslørte ingen forskjeller mellom kontroller eller behandlede grupper.



Figur 3 Oksidasjon av glukose og palmitat i hjertevev fra rotter etter fôring med forskjellige fôrtyper.

Under de gitte forutsetningene tyder resultatene fra denne forsøksserien på at torskprotein ikke har hindret utviklingen av en diabetisk fenotype mhp hjertets metabolisme. Serien skal imidlertid gjentas da fasteperioden for rottene før forsøk kan ha vært i lengste laget. I tillegg skal det tas glukosetoleranse-tester underveis i foringsforsøket for å undersøke insulinsensitiviteten.

### 3.6 Kjemisk sammensetning av torskemuskelprotein framstilt i pilotskala til nytt fôringsforsøk i 2009

Proteinpulveret hadde følgende kjemiske sammensetning:

Protein:	90,1 %
Aske:	5,0 %
Fett:	0,3 %*
Vann:	7,2 %

\* Det ble målt lite fett. Målingen blir dermed litt unøyaktig, og det er grunn til å tro at måleverdien (0.3 %) er noe for høy. Mer spesifikke lipidanalyser er nødvendig dersom nøyaktig fettinnhold skal bestemmes.

Aminosyresammensetning ble bestemt i hydrolyserte prøver av proteinpulver før og etter etanolekstraksjon.

Tabell 4 Mengde aminosyrer i hydrolysater av torskprotein (g/100 g).

Aminosyre	Før etanolekstraksjon	Etter etanolekstraksjon
Asparaginsyre	10,3	10,1
Glutaminsyre	15,7	15,5
Serin	4,6	4,7
Glycin	4,8	4,7
Histidin	2,4	2,4
Arginin	6,8	7,0
Treonin	4,5	4,5
Alanin	5,8	5,8
Prolin	3,3	3,5
Tyrosin	3,7	3,7
Valin	5,5	5,6
Metionin	4,0	3,8
Isoleucin	5,3	5,4
Leucin	8,6	8,7
Fenylalanin	4,3	4,3
Lysin	10,2	10,3

Tabell 4 viser at det er liten forskjell på aminosyresammensetning i hydrolysater av dette proteinpulveret før og etter etanolekstraksjon. Dette indikerer at spesifikke proteinfraaksjoner i liten grad ble ekstrahert bort under etanolekstraksjon.



## 4 Konklusjon

Det er framstilt to prøvepartier (å 5-6 kg) avfettet torskemuskelprotein som er brukt i til in vivo – forsøk med rotter. Forsøkene er utført under ledelse av professor Terje Larsen ved Institutt for Medisinsk Biologi ved UiT.

Resultater fra rotteforsøkene ved IMB kunne ikke, under de gitte forutsetningene, vise at torskeprotein har hindret utviklingen av en diabetisk fenotype mhp hjertets metabolisme. Serien skal imidlertid gjentas da fasteperioden for rottene før forsøk kan ha vært i lengste laget. I tillegg skal det tas glukosetoleranse-tester underveis i foringsforsøket for å undersøke insulinsensitiviteten.

Et tilsvarende prøveparti (ca 10 kg torskemuskelprotein) er brukt til rotteforsøk ved Laval University, Quebec. Detaljerte resultater er foreløpig ikke mottatt, men det ble oppnådd mindre vektøking hos rottene enn forventet. De fysiologiske testene (blant annet test for insulinfølsomhet) var derfor vanskelige å tolke. Resultater vil bli ettersendt så snart de er mottatt.

Ettersom ingen av samarbeidspartnerne er helt ferdige med sine in vivo- forsøk med hel torskemuskel, er det ikke utført rensing av forskjellige muskelproteinfraksjoner i pilotskala. For å tilrettelegge for slik produksjon, er det utviklet metoder på laboratoriet som viser at det er mulig å framstille separate fraksjoner med utstyr som er tilgjengelig i prosesshall ved Nofima Marin i Tromsø. Dermed vil det lett kunne framstilles både myofibrill- og sarcoplasmaproteiner i kg-skala, når dette skulle være ønskelig.

Dersom det påvises klare biologiske effekter ved fôringsforsøk med torskemuskelprotein, vil det være naturlig å utføre tilsvarende forsøk med mer definerte proteinfraksjoner. Det er kjent at det er større forskjell mellom sarcoplasmافرaksjoner fra fisk og varmblodige dyr enn det er mellom myofibrillfraksjonene. Både forsøk med rensset myofibrill- og forsøk med rensset sarcoplasmaprotein vil kunne avsløre om eventuelle effekter skyldes bioaktive stoffer som er knyttet til en bestemt av disse fraksjonene.

## 5 Litteraturliste

- Aasum E., Cooper, M., Severson, D.L. & Larsen, T.S. (2005) Effect of BM 17.0744 a PPAR alpha ligand, on the metabolism of perfused hearts from control and diabetic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 83, 183-190.
- Ackman, R.G. (1995) Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids. In: *Fish and Fishery Products*. (A. Ruiter, Ed.) CAB International, Wallingford, s. 117-156.
- Bordenave, S., Fruitier, I., Ballandier, I., Sannier, F., Gildberg, A., Batista, I. & Piot, I.M. (2002) HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions, effect on guinea pig ileum and ACE activity. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 32, 65-77.
- Bratkovsky S.V., Aasum, E., Riemersma, R.A., Myhre, E.S.P. & Larsen, T.S. (2006) Reduced coronary reserve in response to short-term *ischaemia* and vasoactive drugs in *ex vivo* hearts from diabetic mice. *Acta Physiologica*, 186, 171-177.
- Haard, N.F. (1995) Composition and nutritive value of fish proteins and other nitrogen compounds. In: *Fish and Fishery Products*. (A. Ruiter, Ed.) CAB International, Wallingford, s. 77-115.
- Hafstad A.D., Khalid A.M., How O.J., Larsen T.S. & Aasum, E. (2007) Glucose and insulin improve cardiac efficiency and postischemic functional recovery in perfused hearts from type 2 diabetic (db/db) mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.*, 292, E1288-E1294.
- Hjelmeland, K. & Raa, J. (1980) Fish tissue degradation by trypsin type enzymes. In: *Advances in Fish Science and Technology*. (J.J. Conell, Ed.) Fishing News Books Ltd., Farnham, s. 456-459.
- Pedersen G.M., Gildberg, A., Steiro, K. & Olsen, R.L. (2003) Histone-like proteins from Atlantic cod milt: stimulatory effect on Atlantic salmon leucocytes in *in vivo* and *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 134B, 407-416.
- Pedersen, G.M., Gildberg, A. & Olsen, R.L. (2004) Effects of including cationic proteins from cod milt in feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 233, 31-43.

